



RECEIVED

APR 29 2002

TECH CENTER 1600/2900

Publication No.: Hei.6-30591
Published on: April 27, 1994
Application No.: Sho.59-174213
Filing Date: August 23, 1984
Priority: August 24, 1983 GB 8322750
Applicant: CPC INTERNATIONAL INC.
Inventors: Jean-Claude de Troostenbergh
Bernard Léon Henri Marie Avalosse
René Louis Mignolet

Title: Industrial-scale process for the production of polyols by fermentation of sugars

Claims:

1. An industrial process for producing polyols, especially erythritol and/or ribitol, by the aerobic fermentation of a suitable sugar by Moniliella tomentosa var. pollinis characterized by the provision for the presence in the fermentation medium of a water-soluble or water-dispersible polymer which is capable of retaining the cells in the fermentation medium.
2. The process of Claim 1 characterized in that the polymer is acid polymer.
3. The process of Claim 2 characterized in that the acid polymer is Xanthan gum.
4. The process of Claim 3 characterized in that the Xanthan gum is present in an amount between 100 ppm and 500 ppm of the fermentation medium.
5. The process of any one of the Claims 1 to 4 characterized in that a conventional antifoam agent is also added to the fermentation.
6. The process of any one of the claims 1 to 5 characterized

in that the air flow rate is between 0.1 and 1.5 liter/liter fermentation medium/minute.

7. The process of any one of the claims 1 to 5 characterized in that the sugar is dextrose.

8. The process of any one of the claims 1 to 7 characterized in that the sugar is present in the fermentation broth at the beginning of the fermentation in an amount of between 20% and 45%.

9. The process of any one of the claims 1 to 7 characterized in that the pH at the beginning of the fermentation is adjusted to between 8 and 6, preferably between 4 and 5.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平 6 - 3 0 5 9 1

(24) (44) 公告日 平成 6 年 (1 9 9 4) 4 月 2 7 日

(51) Int. Cl. ⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I
C12P 7/18 9282-4B
//(C12P 7/18
C12R 1:645)

発明の数 1 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願昭 5 9 - 1 7 4 2 1 3
(22) 出願日 昭和 5 9 年 (1 9 8 4) 8 月 2 3 日
(65) 公開番号 特開昭 6 0 - 1 1 0 2 9 5
(43) 公開日 昭和 6 0 年 (1 9 8 5) 6 月 1 5 日
(31) 優先権主張番号 8 3 2 2 7 5 0
(32) 優先日 1 9 8 3 年 8 月 2 4 日
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 9 9 9 9 9 9 9 9
シー・ビー・シー・インターナショナル
・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー州
、エングルウッド・クリフス、インター
ナショナル・プラザ (番地無し)
(72) 発明者 ジャン・クロード、ドウ、トロステンベ
ルク
ベルギー国、ウーウアート、クレールベ
ーク モーレン、3 0 5
(72) 発明者 ベルナル、レオン、アンリー、マリー
・アヴァロツズ
ベルギー国、アジモン、リュ、デュ、コ
ルミー 7 4
(74) 代理人 弁理士 江崎 光好 (外 1 名)

審査官 内田 俊生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖類の発酵によりポリオールを工業的規模で製造する方法

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニス (Moniliella tomentosa var. pollinis) による適当な糖の好気性発酵によりポリオール、特にエリトリールおよび/またはリビトールを工業的に製造する方法において、発酵培地中に細胞を保持する能力のある水溶性のまたは水に分散性の多糖類を発酵培地に存在させることを特徴とする方法。

【請求項 2】 多糖類が酸性の多糖類であることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 3】 酸性の多糖類がキサンタンガム (Xanthan gum) であることを特徴とする特許請求の範囲第 2 項記載の方法。

【請求項 4】 キサンタンガムが発酵培地の 1 0 0 p p m と 5 0 0 p p m の間の量において存在することを特徴と

2

する特許請求の範囲第 3 項記載の方法。

【請求項 5】 通常の消泡剤がまた発酵に対し添加されることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】 空気の流速が 0 . 1 ℓ / 発酵培地 ℓ / 分と 1 . 5 ℓ / 発酵培地 ℓ / 分の間にあることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 5 項のいずれか 1 項に記載の方法。

10 【請求項 7】 糖がデキストロースであることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 5 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】 発酵の初めに、糖が 2 0 % ～ 4 5 % の間の量において発酵プロセス中に存在することを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】発酵の初めに、pH が 8 と 6 の間、好適には 4 と 5 の間に調整されることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明はモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニス(*Moniliella tomentosa* var. *pollinis*)のような糖寛容性の菌で糖を好気性発酵させることによりポリオール、特にエリトリトールおよび／またはリビトールを工業的規模で製造する方法に関する。

酵母様の菌であるモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスによる適当な糖の好気性発酵はエリトリトールを生産することが知られている。このことは、先ず G. J. Hajny, J. H. Smith および J. C. Garver により *Applied Microbiology* 12, p. 240-246 (5月1964) に報告された。そして彼等は微生物を *Torula* I₁A (*Torula* I₁A) と命名した。後に、Antonie van Leeuwenhoek 37, p. 107-118 (1971) において、L. Dooms, G. L. Hennebert および H. Verachtert はこの菌をモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスとして分類し、そのエリトリトールを生産する能力を確認した。この著者等は、またこの微生物の完全な形態学的記述をし、これには参考文献が加えられている。更に、彼等は、モニリエラに適用した培養条件にしたがい 2 つの形、すなわち酵母様の形と糸状菌様の形のもとに存在することができることを認めている。上記文献の p. 110 において、彼等は次のように述べている。

「寒天斜面培養では両方の形がつくられている。静置液体培地では、豊富な菌糸と、分芽孢子より多い分節孢子をもつ糸状菌様の形が発達する。振盪フラスコ培養では、出芽および分裂によりつくられる円形、卵形、および方形の細胞をもつ酵母様の形が優勢であり、菌糸は形成されない。」

エリトリトールを工業的規模で製造する方法をもくろんだ試みにおいて、仕事の初めに 2 ℓ の発酵槽を、続いて 600 ℓ の発酵槽を使用したとき、発酵培地中の細胞分布の問題に出会った。すなわち、細胞は培地の表面に集まる傾向があり、そのため大抵の発酵方法で生ずる泡を媒介として重大な損失が起ることが見いだされた。この問題は、細胞が泡によって発酵槽から運び出され、発酵槽は短時間内に大部分の細胞が涸渇するというほど激烈なものであった。この問題を解決するための 1 つの慣例的な策は市販されて手に入れることができる消泡剤を用いて泡を減少することであった。そして本発明者等の研究中でも、多数のこのような製品が試みられた。これら製品には次のようなものが含まれる：ユニオン・カーバイド (Union Carbide) からの SAG 471 (ジメチルポリシロキサン・シリコンオイル)、ソフオーズ (Sophos) からのビオスブメックス (Biospumex) 05 (脂肪酸アルコールのポリオキシエチレン誘導体)、シル・アンド・セイラシヤー (Schill and Seilacher) からのストラクトール (Struktol) SB 2020 (脂肪酸アルコールおよびエステル混合物)、ダウ、コーニン

グ・サーブア (Dow Corning Serva) からのシリコン M 30 (ジメチルポリシロキサンの 30 % 水溶液)、およびシグマ (Sigma) からのアンチフォーム (Antifoam) C (シリコンポリマー)。しかし、どの場合も、上記問題の意義ある緩和はなく、泡は、消泡剤を無効にする程度にまで微生物細胞により安定化された。

さて、本発明者等は、以下に記載するような特徴を有する多糖類を発酵培地に添加することにより、泡の形成にもかかわらず、細胞が発酵培地中に保持されることを見い出した。

本発明にしたがうモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスの細胞で適当な糖を好気性発酵させることにより、ポリオール、特にエリトリトールおよび／またはリビトールを工業的に製造する方法は、発酵培地中に細胞を保持する能力のある水溶性のまたは水に分散性の多糖類を発酵培地に存在させることにより特徴づけられる。この多糖類は、モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスに対して無毒性でなければならず、そして発酵方法に関し不利な影響をもたはならない。理論的説明により結びつけられることを欲することなしに、本発明者等は、微生物の細胞が、発酵を増進するその能力に影響されることなしに発酵プロセス中に細胞を保持する多糖類とルーズな結合を形成するものと信ずる。

本発明者等は、特に適切な多糖類はキサンタンガム (Xanthan gum) であることを見い出したが、類似の多糖類も発酵培地中で簡単なテストを行なうことによって選択することができる。多糖類と微生物の細胞との間の結合は、キサンタンガムが酸性の多糖類であるので、多糖類の酸性の基の存在により助けられることがありうる。

キサンタンガムを用いた場合、本発明者等は、少なくとも 100 ppm 存在させるのが好ましく、そして優れた結果は約 300 ppm で得られることを見い出した。発酵培地中に細胞を保持するに對し必要とするより多い (すなわち、約 500 ppm より多い) 多糖類を用いることもできるが、このような過剰量は不経済である。

全面的な方法は、また従来の消泡剤を発酵培地に含有させることにより改良される。合成消泡剤 (例えばシリコンタイプまたは脂肪族アルコール) は天然の生成物 (例えばラード油) よりも好適である。なぜならば、合成消泡剤はずっと小量で使うことができ、そして最終の発酵プロセスはそれを除去するための広範な精製を必要としないからである。市販の大抵の合成消泡剤は、200-300 ppm または 400 ppm を用いれば、最適の泡制御に對し十分である。

本発明方法の所望の生成物はエリトリトールおよび／またはリビトールである。従来の当業界の専門家達は、モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスによる糖類の発酵からはエリトリトールのほかにグリセロールおよびアラビトールが生産されることを報告している。本発明方法によると、アラビトールは生産されないが、エリト

リトールおよびグリセロールのほかにリビトールが得られ、これらの3つが形成される唯一のポリオールである。代表的には、発酵により全ポリオールに基づき次の割合—リビトール1%—20%、グリセロール5%—40%、残りはエリトリトールである—でリビトール、グリセロール、およびエリトリトールよりなる生成物が製造される。

モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスは、オランダ国 (Baarn の Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS)) より CBS 461.67 として手に入れることができ、この菌はまた英国 Ferry Lane, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AF の Commonwealth Mycological Institute Culture Collection (CMicc) に番号 (CMicc) 271648 のもとに寄託されており、ここより一般に手に入れることができる。

この微生物の細胞は、麦芽エキス (4%)、酵母エキス (0.2%)、および寒天 (2%) を含有する固体培地で培養される。このようにして形成された培養物は、つぎに糖 (その量は後記する) および窒素源を含有する殺菌した培地に接種される。上記したような多糖類 (好適には約 300ppm の量におけるキサンタンガム) が添加され、そしてまた好ましくは通常の消泡剤 (200ppm のジメチルポリシロキサン消泡剤のような) が添加される。本明細書の発明の詳細な説明および特許請求の範囲において、特に言明しないかぎり、% および部は容量% および容量部である。

空気は、発酵容器の大きさおよび発酵容器のは、0.5% 酵母エキス + 0.1% 尿素で、あるいは 2% コーンステープリカー + 0.02% 尿素で良い結果が得られる。

出発 pH は約 3.0 と 6.0 の間にあるべきであり、この pH は発酵中に約 2.0 ないし 3.5 に減少される。

L. Hanssens, A. Van Regenmortel, および H. Verachtert Applied Microbiology, Vol. 24, No. 5, p. 831-833 (11月1972) によると、異なる一定 pH で行なわれた実験室での発酵は全ポリオールおよびエリトリトールの収量に実質的な差異を生ずるということである。本発明者等は、より大きな規模の発酵 (2ℓ の発酵槽またはそれ以上の発酵槽) を実施するとき、全ポリオールおよびエリトリトールの収量は 4.0 ないし 6.0 の範囲内に出発 pH に対してはさほど敏感でないことを見出した。汚染の問題を避けるため、または最小にするためには、4 ないし 5 の出発 pH が好ましい。発酵は糖がすべて消費されるまで行なわれ (発酵時間は使用する糖の量により通常 4 日と 12 日の間である)、その後、培養は停止され、細胞が例えば遠心分離により培養ブロスより除去される。細胞を含まない培養ブロスは、エリトリトール、リビトール、およびグリセロールを含有し、それ自体で、精製し (例えば限外濾過および脱鉱物により) または精製することなく、若干の用途に、例えばポリマー工業に用いられることができる。精製した培養ブロスは、また 60% ないし 80% 溶解した固体まで濃縮されることができ、そしてこれから例えば

J. M. Roxburg, J. F. T. Spencer, および H. R. Sallens により Canadian Journal of Technology, Vol. 34, p. 248-253 (1956) に記載された技術により、エリトリトールが結晶化されることができる。エリトリトールの結晶の回収後に残存する液—この液はまた (結晶化されなかつた) エリトリトール、リビトール、およびグリセロールの混合物である—は、また適当な処理後に用いられることができる。

次の例は本発明の実施を例示するためのものである。

10 接種用培養物の調整

20% デキストロース、0.5% 酵母エキス、0.1% 尿素、および 300ppm キサンタンガムよりなる培地 50ml を入れた 500ml のエルレンマイヤーフラスコに固体培地からのコロニーが接種され、出発 pH 5、温度 30°C で 100rpm の往復攪拌のもとに、3 日ないし 4 日間培養が行なわれた。これらの培養物が以下の例に用いられた。

例 1

32% デキストロース、0.5% 酵母エキス、および 0.1% 尿素よりなる培地 1.5ℓ を入れた 2 つの 2ℓ 発酵槽に接種用培養物が接種された。1 つの発酵槽には、市販されて手に入れることができるジメチルポリシロキサン消泡剤 (ユニオン・カーバイドからの SAG 471) 300ppm が添加された。他の発酵槽には、この消泡剤 300ppm に加えてキサンタンガム 300ppm が添加された。培地には 1ℓ 空気/発酵培地 ℓ/分の流速、そして 680rpm の羽根車の速度で空気が供給された。温度は 30°C で出発 pH は 5 であった。2 日の操作後に、キサンタンガムが添加されなかつた発酵槽のプロスの表面に微生物の細胞が現われ、そして最終的に発酵槽から運び出された。キサンタンガムが 20 添加された発酵槽では、細胞はすべてブロス中に保持された。9 日後、培地中の細胞密度は、キサンタンガムの不存在では 30×10^4 /ml であり、キサンタンガムの存在では 250×10^4 /ml であった。デキストロースの濃度は、キサンタンガムの存在および不存在において、それぞれ 4% および 18% であった。そしてそれぞれのエリトリトール (および全ポリオール) 濃度は 9.2% (10.8%) および 1.5% (2.6%) であった。

本例は、次の追加的な市販の消泡剤: ピオスプメックス 05 (ソフォ-ズ)、ストラクトール SB2020 (シ・ア・ンド・セイシャ-)、シリコン M30 (グ・コ・ニグ・サ・フ) を、すべて 300ppm の量において用いて繰返された。どの場合の結果も同じであり、消泡剤単独では細胞の溜渇を防止するのに効果的でなかつた。

例 2

20% から 45% までの変えた量のデキストロース、0.5% 酵母エキス、および 0.1% 尿素、これに加えて 300ppm の SAG 471 消泡剤および 300ppm のキサンタンガムよりなる培地 1.5ℓ を入れた 6 つの 2ℓ 発酵槽に、前記の例におけると同様にして接種が行なわれた。羽根車の速度は 700rpm、空気の流速は 1ℓ/発酵培地 ℓ/分、そして出発 pH は 5 で

あった。培養プロセスのデキストロースおよびポリオール濃度が毎日測定された。そして培地はデキストロースが消費されるまで発酵された。しかし、最大期間は9日であった。その結果は第1表に示すとおりである。

第 1 表

出発デキストロース%	エリトリトール濃度% (W/V)	全ポリオール濃度% (W/V)	エリトリトール収量%
20	7.8	8.0	38
25	10.5	11.0	42
30	11.2	12.2	37
35	11.5	13.0	33
40	8.2	9.2	27
45	7.5	9.2	26

(例) (1) 全ポリオールはエリトリトールおよびグリセロールおよびリビトールである。

上記データから認められるように、最高のエリトリトール濃度は35%デキストロースで得られたが、使用したデキストロースに基づいた最高のエリトリトール収量は25%デキストロースで得られた。

例 3

出発pHを変えることの影響

前記の例におけるように、32%デキストロース、これに加えて酵母エキス、尿素、消泡剤、およびキサントガンムよりなる培地1.5ℓを入れたエルレンマイヤーフラスコに接種が行なわれた。羽根車の速度は680rpmで、空気の流速は1ℓ/分発酵培地ℓ/分であった。培養プロセスの出発pHが1NのHClまたは1NのNaOHを用いて、それぞれ2、3、3.5、4、および6の値に調整された。最終のエリトリトールおよびポリオールの濃度が9日後に測定された。その結果は第2表に示すとおりである。

第 2 表

出発pH	最終pH	エリトリトール濃度% (W/V)	全ポリオール濃度% (W/V)
6	2.9	11.1	14.7
4	2.6	11.7	13.8
3.5	2.2	9.7	11.4
3	2.0	7.6	10.0
2	1.9	0.02	0.02

上記データから、4ないし6の範囲内の異なる出発pH値からはエリトリトールの生産、または全ポリオールの生産における重大な差異は生じないことが認められる。

例 4

酸素の移動割合を変えることの影響

前記した例の培地と同様なキサントガンムおよび消泡剤を含む培地を入れた6つの2ℓ発酵槽に接種が行なわれた。空気の流速は1ℓ/分発酵培地ℓ/分で、羽根車の速

度が400rpmと790rpmの間で変えられた。培養プロセスのエリトリトールの濃度および全ポリオールの濃度が11日後に測定された。その結果は第3表に示すとおりである。

第 3 表

羽根車の速度	エリトリトールの濃度%	全ポリオールの濃度%
400	8.1	9.3
460	8.1	9.1
585	8.9	10.1
680	10.7	13.1
740	11.2	15.9
790	9.2	16.2

上記データから認められるように、エリトリトールの濃度および全ポリオールの濃度の両方とも通気割合の増加とともに増加した。

例 5

コーンステープリカーの使用

32%デキストロース、2%コーンステープリカー（50%溶解した固体）、0.02%尿素、300ppmのSAG471消泡剤、および300ppmのキサントガンムよりなる培地1.5ℓを入れた2ℓ発酵槽に接種用培養物が接種された。空気の流速は1ℓ空気/分発酵培地ℓ/分、羽根車の速度は740rpmであった。発酵は11日間行なわれた。この期間の後、発酵培地のエリトリトール含量は11%であることが認められ、全ポリオール含量は15%であることが認められた。平均の毎日のデキストロース消費は30g/ℓ/日であった。

例 6

32%デキストロース、0.5%酵母エキス、0.1%尿素、300ppmのキサントガンム、および300ppmの消泡剤SAG471よりなる培地450ℓを入れた600ℓの塔式発酵槽に5%の接種用培養物が接種された。出発pHは5で、塔を通しての空気の流速は225ℓ/分であった。13日後、最終の培養プロセスは、10.8%エリトリトール、5.6%グリセロール、1.7%リビトール、および0.8%デキストロースを含有した。エリトリトールの収量は消費したデキストロースの34%で、全ポリオールの収量は消費したデキストロースの56%であった。

代表的な回収操作において、細胞は遠心分離により除去され、培地は限外濾過により清澄にされ、そしてイオン交換体で精製された。この無色のプロセスは70%溶解した固体まで濃縮され、この液体からエリトリトールが次の手段で結晶化された。温度が65℃にもたらされ、ついで時間あたり2℃の割合で冷却されて約室温までにされた。濾過により結晶が回収され、そしてエタノールで1度洗浄された。代表的な結晶収量は74%で、残存する液体の組成はエリトリトール132g/ℓ、グリセロール152g/ℓ、リビトール79g/ℓであった。一般に、エリトリトールの結晶化後に残留する液体の組成は、全ポリオ

ールに基づき次の割合ーリビトール 5 % - 30%、グリセ
ロール 30% - 60%、残りはエリトリトールであるーで、リ

ビトール、グリセロール、およびエリトリトールを含有
する。

フロントページの続き

(72) 発明者 ルネ・ルイス・ミニヨレ
 ベルギー国、ケセルーロー、マルトラ
 レンラン、 1-8 3